

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-083968

(43)Date of publication of application : 19.03.2003

(51)Int.Cl. G01N 33/53

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 27/27

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/483

G01N 33/58

G01N 37/00

(21)Application number : 2001-280137 (71)Applicant : JSR CORP

(22)Date of filing : 14.09.2001 (72)Inventor : YAMANA KAZUNARI
KUMAMOTO SATOSHI
HASEGAWA TETSUYA
NAKANO HIDEHIKO
MATSUO YOSHIAKI

SUGIE TASOHIRO

(54) DNA CHIP AND ASSAY METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a stable DNA chip having high detection sensitivity, low in noise, shortening the insertion time of an intercalator and capable of detecting DNA in a short time.

SOLUTION: The DNA chip has an electrode having a DNA probe, which has the intercalator coupled therewith, fixed thereto.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The DNA chip characterized by having the electrode which fixed the DNA probe with which the intercalator is combined.

[Claim 2] The DNA chip according to claim 1 characterized by an intercalator being a conductive organic compound.

[Claim 3] A conductive organic compound Anthraquinone, a naphthoquinone, a quinone, a porphyrin, A daunomycin, ferrocene, and ferrocene-ized naphthalene diimide derivative, A water-soluble fullerene derivative, ethidium, the ethidium bromide, an acridine, Aminoacridine, an acridine orange, an azide acridine, ethidium mono-azide, Ethidium diazido, proflavine, ellipticine, Hoechst 33342, the HOECHST 33258, AKURA ruby gin, DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), Adriamycin, the EPIRU vicine, the BIRARU vicine, AKURASHINO mycin, A tris (phenanthroline) zinc complex, a tris (phenanthroline) ruthenium complex, A tris (phenanthroline) cobalt complex, a phenanthroline platinum complex, A bipyridine platinum complex, a tris (bipyridyl) zinc complex, a tris (bipyridyl) ruthenium complex, The DNA chip according to claim 2 characterized by being the compound chosen from a tris (bipyridyl) cobalt complex, a JI (bipyridyl) zinc complex, a JI (bipyridyl) ruthenium complex, and a JI (bipyridyl) cobalt complex, or its derivative.

[Claim 4] The DNA chip according to claim 3 characterized by an intercalator being the anthraquinone which carried out covalent bond to - OH radical like 2' of the sugar in the sugar frame of a DNA probe through the alkylene group, or its derivative.

[Claim 5] The DNA chip according to claim 1 to which the end of the DNA probe with which the intercalator is combined is characterized by thiol-ization or being disulfide-ized.

[Claim 6] The assay approach using the DNA chip characterized by contacting the target matter which is a specimen to the DNA chip which has the electrode which fixed the DNA probe with which the intercalator is combined, and subsequently detecting I/O of the electrical signal to an electrode.

[Claim 7] Said target matter is the assay approach according to claim 6 characterized by being a nucleic acid or protein.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
 - 2.**** shows the word which can not be translated.
 3. In the drawings, any words are not translated.
-

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the assay approach using the DNA chip which comes to introduce Qualification DNA, and the DNA chip concerned.

[0002]

[Description of the Prior Art] Genome projects including a human gene were advanced and much gene structures have been clarified. The gene function which used the result of gene structural analysis effectively, and research of a manifestation serve as an important theme for paving the new path for not only the elucidation of the mystery of a life process but prevention of a disease, a diagnosis, development of drugs, etc. In order to advance these researches, it is important to analyze gene expression, and variation and polymorphism. In order to perform such analysis simple and quickly, it is indispensable to act as the monitor of the association (hybridization) of the specimen DNA set as a DNA probe with a predetermined base sequence and the object of analysis efficiently.

[0003] In the former, the detection which used the radioisotope or the fluorescent substance for detection of the specimen DNA after hybridization, or electrochemical detection has been adopted. In order to raise the sensibility of detection, external inserting type intercalators, such as a HOECHST 33258, Hoechst 33342, ferrocene, and ferrocene-ized naphthalene diimide derivative, a water-soluble fullerene derivative, a ruthenium complex, a zinc complex, a platinum complex, and a cobalt complex, have been used.

[0004] However, these external intercalators are combined not only with the double stranded DNA specifically formed in a DNA probe and this DNA probe by DNA which

has a complementary array but with a single stranded DNA, and since this association generates the signal based on things other than double stranded DNA, it serves as a detection noise and arises [the result to which the specific binding detection sensitivity of double stranded DNA is reduced].

[0005] Moreover, although electrochemical detection was the detection approach desired from detection sensitivity being good, in order to secede from the double stranded DNA which the conventional intercalator combined quickly, the trouble that the condition that the intercalation happened was unstable and it was difficult to detect an intercalation electrochemically existed. Then, this invention is made in view of the actual condition mentioned above, and aims at offering the DNA chip for offering the DNA chip in which the DNA detection with high detection sensitivity is possible, and the assay approach using this DNA chip.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The DNA chip concerning this invention is characterized by having the electrode which fixed the DNA probe with which the intercalator is combined, in order to solve the problem mentioned above. Moreover, it is desirable that an intercalator is a conductive organic compound. Furthermore, a conductive organic compound Anthraquinone, a naphthoquinone, a quinone, A porphyrin, daunomycin, ferrocene, and ferrocene-ized naphthalene diimide derivative, A water-soluble fullerene derivative, ethidium, the ethidium bromide, an acridine, Aminoacridine, an acridine orange, an azide acridine, ethidium mono-azide, Ethidium diazido, proflavine, ellipticine, Hoechst 33342, the HOECHST 33258, AKURA ruby gin, DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), Adriamycin, the EPIRU vicine, the BIRARU vicine, AKURASHINO mycin, A tris (phenanthroline) zinc complex, a tris (phenanthroline) ruthenium complex, A tris (phenanthroline) cobalt complex, a phenanthroline platinum complex, A bipyridine platinum complex, a tris (bipyridyl) zinc complex, a tris (bipyridyl) ruthenium complex, It is desirable that they are the compound chosen from a tris (bipyridyl) cobalt complex, a JI (bipyridyl) zinc complex, a JI (bipyridyl) ruthenium complex, and a JI (bipyridyl) cobalt complex or its derivative. It is desirable that they are the anthraquinone in which the intercalator carried out covalent bond to - OH radical like 2' of the sugar in the sugar frame of a DNA probe through the alkylene group especially, or its derivative.

[0007] Moreover, it is desirable thiol-ization or that the end of the DNA probe with which the intercalator is combined is disulfide-ized. The assay approach concerning this invention contacts the target matter which is a specimen to the DNA chip which has the electrode which fixed the DNA probe with which the intercalator is combined,

and the DNA chip characterized by subsequently detecting I/O of the electrical signal to an electrode is used for it.

[0008] Moreover, as for said target matter, it is desirable that they are a nucleic acid or protein.

[0009]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the concrete mode of the DNA chip concerning this invention and the assay approach is explained to a detail, referring to a drawing. One embodiment of said DNA chip has the structure where the electrode (henceforth a "probe fixed electrode") which fixes a DNA probe to the whole surface of the substrate which has a suitable area is formed, come to form in another field of a substrate the electrode (henceforth a "detection electrode") which can contact electric detection equipment, and said two electrodes flow electrically.

[0010] The result which has examined wholeheartedly that this invention person detects DNA hybridization using an electric signal (electrochemistry signal), By making the intercalator which has electrochemistry activity insert between the base pairs of a DNA double helix (intercalation) The electronic transition reaction by the pi electron occurs between a DNA base pair and an intercalator, and it finds out that the electric signal produced by this electronic transition reaction can be used as a direct monitor signal, and came to complete this invention.

[0011] Therefore, as for such an intercalator, it is desirable that it is a conductive organic compound. This conductive organic compound Furthermore, anthraquinone, a naphthoquinone, A quinone, porphyrin, daunomycin, ferrocene, and ferrocene-ized naphthalene diimide derivative, A water-soluble fullerene derivative, ethidium, the ethidium bromide, an acridine, Aminoacridine, an acridine orange, an azide acridine, ethidium mono-azide, Ethidium diazido, proflavine, ellipticine, Hoechst 33342, the HOECHST 33258, AKURA ruby gin, DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), Adriamycin, the EPIRU vicine, the BIRARU vicine, AKURASHINO mycin, A tris (phenanthroline) zinc complex, a tris (phenanthroline) ruthenium complex, A tris (phenanthroline) cobalt complex, a phenanthroline platinum complex, A bipyridine platinum complex, a tris (bipyridyl) zinc complex, a tris (bipyridyl) ruthenium complex, A tris (bipyridyl) cobalt complex, a JI (bipyridyl) zinc complex, a JI (bipyridyl) ruthenium complex, It is desirable that they are the compound chosen from external inserting type intercalators, such as a JI (bipyridyl) cobalt complex, other ruthenium complexes, a zinc complex, a platinum complex, and a cobalt complex, etc. or its derivative, and especially anthraquinone, a naphthoquinone, and a quinone are desirable.

[0012] Moreover, in order for it to become a rate-determining step to approach the DNA base pair which is in a hydrophilicity-environment in an intercalation reaction since the intercalator which generally consists of condensation of a ring has high hydrophobicity and to detect an intercalation generally, it is difficult to have to wait until an intercalation reaction will be in equilibrium, and to perform quick detection.

[0013] Then, an intercalator is fixed in a DNA strand, namely, it becomes possible by carrying out covalent bond of one of the radicals and intercalators of a DNA strand to perform an intercalation reaction quickly. this invention person developed the general approach with the sufficient effectiveness which introduces an intercalator to the sugar frame of the arbitration of DNA, as a result of examining introducing an intercalator into a DNA strand wholeheartedly.

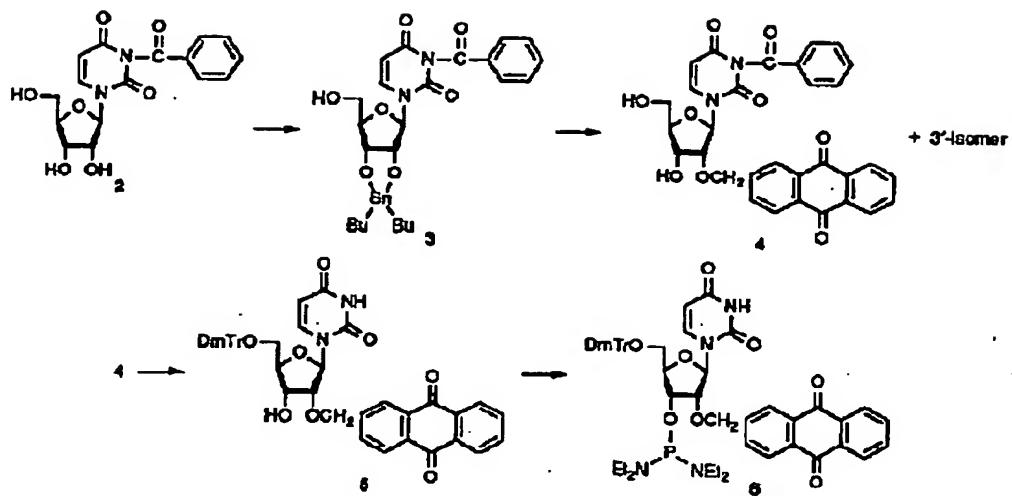
[0014] According to this approach, it was most efficient to have introduced an intercalator at least into 2' of the sugar frame of a DNA strand, and it turned out that an intercalator can be introduced into a DNA strand. Therefore, in this mode, it is desirable to - OH radical like 2' of sugar [in / in an intercalator / the sugar frame of a DNA probe] that they are especially the alkylene group of carbon numbers 1-2, the anthraquinone which carried out covalent bond through the methylene group of a carbon number 1 preferably, or its derivative.

[0015] The approach of compounding such a qualification DNA probe is the monomer which introduced anthraquinone at least into 2', for example, 2'-O-anthraquinonyl methyl. The usual solid-state-polymerization method performed by applying to a DNA automatic composition machine, using N3-benzoyl uridine friend DAITO as one of the raw material DNA monomers is mentioned. The compound qualification oligonucleotide can be used after performing logging from the support by the usual approach, i.e., ammoniation, purification by polyacrylamide electrophoresis (PAGE), and demineralization processing.

[0016] Here, it is for example, 2'-O-anthraquinonyl methyl. The approach of obtaining N3-benzoyl uridine friend DAITO is Yamana et. It is compounded and obtained according to al.Bioconjugate Chem.1990, 1, and the approach indicated in 319-324, i.e., the following scheme.

[0017]

[Formula 1]



[0018] Moreover, although it will not be limited especially if the quality of the material of a probe fixed electrode can fix a DNA probe and has conductivity, the carbon of metal simple substances, such as gold, silver, copper, platinum, aluminum, nickel, palladium, germanium, molybdenum, and a tungsten, those alloys, graphite, and a diamond thin film etc. is usable, for example. In these, carbon, gold, and platinum are desirable and the gold which carried out especially 111 crystal orientation is desirable.

[0019] Although especially the formation approach of these electrodes is not limited, the above-mentioned conductive ingredient layers (the above-mentioned metal etc.) are formed by approaches, such as vacuum evaporation, a sputter, and plating, on an organic or inorganic insulating base material, and it can carry out electrode patterning by approaches, such as a photoresist. It is possible to carry out patterning not only of an electrode but the wiring which ties a connection terminal, and the electrode and connection terminal to electrochemical detection equipment collectively in that case.

[0020] Moreover, although especially the approach of fixing a DNA probe on an electrode is not limited, it is an approach of preparing a covalent-bond radical for an electrode side in amino processing, a carbodiimide or the approach of carrying out silane coupling processing and carrying out covalent bond of a DNA probe and the electrode, and a DNA end beforehand etc. In these, thiol-izing or especially the approach of disulfide-izing is desirable in the approach, for example, a DNA probe end, of preparing a covalent-bond radical in a DNA end.

[0021] generally, it sticks to a thiol and a disulfide compound on a golden front face, a self-organizing monomolecular film is formed, and there are few defects -- high -- producing an orientation monomolecular film is known. Therefore, it is desirable to make the DNA probe with which the intercalator is combined stick to thiol-izing or the

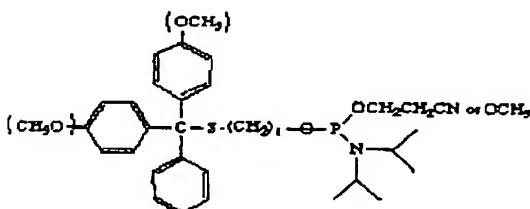
quality-of-the-material front face which disulfide-izes and forms a probe fixed electrode in this thiol group or a disulfide radical ($-S-S-$). It is desirable to carry out covalent bond of a thiol or the disulfide compound to $-OH$ radical of the three-dash terminal of the chain of a DNA probe or a five prime end especially.

[0022] The usual solid-state-polymerization method performed by applying the approach of obtaining this thiol-izing or disulfide-ized DNA probe to a DNA automatic composition machine using the commercial formation of thiol induction or disulfide induction-ized reagent which combined the qualification nucleoside phosphoroamidite which is used for the DNA probe composition which introduced the intercalator, and which is a monomer is mentioned. The compound qualification oligonucleotide can be used after performing logging from the support by the usual approach, i.e., ammoniation, purification by polyacrylamide electrophoresis (PAGE), and demineralization processing.

[0023] Here, what has the following structure is mentioned as a thiol-ized reagent.

[0024]

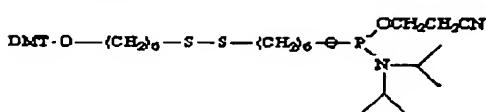
[Formula 2]



[0025] Moreover, what has the following structure is mentioned as a disulfide induction-ized reagent.

[0026]

[Formula 3]



[0027] In addition, an ion spray mass spectrum can perform this formation of thiol induction, or the structure check of the disulfide induction-ized intercalator installation DNA. In the production approach of a probe fixed electrode, if the case where the electrode quality of the material is gold is mentioned as an example, first, gold is vapor-deposited on slide glass, an electrode substrate is obtained, and it cuts in the magnitude of a request of this slide glass if needed, and a silver paste and

adhesives will be used for the obtained electrode substrate, lead wire will be fixed to it, and a golden electrode will be produced. Furthermore, after it processes the front face of this golden electrode from an acid if needed and water and a phosphate buffer solution wash, the probe fixed electrode with which the qualification DNA probe was fixed to the golden front face is obtained self-integration of the qualification DNA probe to a golden electrode surface, or by carrying out the spot of the qualification DNA probe to a golden surface electrode by the spotter by dipping a golden electrode in the phosphate buffer solution containing a qualification DNA probe.

[0028] Moreover, one embodiment of the assay approach concerning this invention contacts the target matter which is a specimen to the DNA chip which has the electrode which fixed the DNA probe with which an intercalator which was mentioned above is combined, and, subsequently detects I/O of the electrical signal of an electrode, i.e., a detection electrode. Here, nucleic acids, such as DNA and RNA, protein, etc. are mentioned as said target matter.

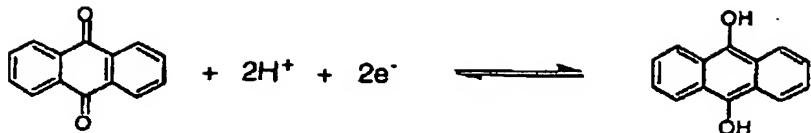
[0029] Moreover, as an electrical signal detected, electric signals, such as a current, electric conductivity, potential, electric capacity, an inductance, and an impedance, are mentioned, and it is measured by equipments, such as cyclic Volta mole (fee valve flow coefficient) differential pulse Volta MOGURAFI (DPV), linear sweep Volta MOGURAFI, and a potentiostat.

[0030] For example, in the monitor by valve flow coefficient, the curve obtained in the example mentioned later as shown in drawing 1 is obtained. In drawing 1, a continuous line shows the curve of the DNA origin of a single chain, and the chain line shows the curve of the duplex-deoxyribonucleic-acid origin after an intercalation reaction.

According to drawing 1, the system of the potential which gives the peak current of a reduction reaction curve (above) (mV), i.e., summit potential, from which the intercalation produced the summit potential (mV) which gives the peak current of an oxidation reaction curve (below) is smaller. This shows that the following oxidation reduction reactions occur at an electronic transition reaction, i.e., an anthraquinone part, between an intercalator and the base pair of DNA, change arises in the electronic state of a system, and the shift of such summit potential arises, when an intercalation happens.

[0031]

[Formula 4]



$$K = [\text{AQH}_2] / [\text{AQ}] [\text{H}^+]^2 \quad (1)$$

$$E = E_0 - (RT / nF) \ln K \quad (2)$$

[0032] In this oxidation reduction reaction, a reduction reaction is the right and oxidation reaction is the left. Moreover, the equilibrium constant K of this reaction is carried out like a formula (1), and is called for. Among a formula (1), $[\text{AQH}_2]$ shows the concentration of the anthraquinone (right) of a reduction type, and $[\text{AQ}]$ shows the concentration of the anthraquinone (left) of an oxidation type. Moreover, potential (reaction potential) is searched for by the formula (2). E_0 shows the equilibrium electrode potential in reference condition (activity constant 1) among a formula (2), R shows a gas constant, T shows the temperature of a system, F shows a Faraday constant, and n shows ionic valency.

[0033] Therefore, it is possible to detect formation of a duplex chain by detecting the existence of a shift of this potential. Moreover, according to said formula (2), it depends for potential on the equilibrium constant K of an oxidation reduction reaction, and depends for this equilibrium constant K on the concentration $[\text{AQH}_2]$ of the anthraquinone of a reduction type. This means that it is dependent on the concentration of the anthraquinone which participated in the intercalation, and can know the concentration of the anthraquinone which participated in the intercalation, i.e., the concentration of the specimen in a sample, because this investigates summit potential.

[0034] In addition, if an intercalation reaction occurs, it is possible that the chemistry environment of the intercalator installation DNA changes. On the other hand, it is thought that it depends for change of this chemistry environment also on the class of base sequence of DNA. Therefore, based on results of an investigation, it can detect now that variation, such as a mismatch base pair, exists in DNA of a specimen etc. by investigating systematically change of the electronic state based on an electronic transition reaction according to a DNA sequence.

[0035] Moreover, RNA-DNA hybridization is also detectable besides a DNA duplex chain. Moreover, it is known like a DNA-protein interaction that the reaction of DNA and other drugs will change DNA structure a lot. Therefore, it becomes possible to

detect using the DNA chip which such an interaction also requires for this invention in order to change the electrical signal to generate.

[0036] The DNA chip and the assay approach of this invention are applicable to fields, such as safety toxicity inspection of gene expression analysis, 1 gene polymorphism analysis (SNP), a physic innovative drug development, screening of drugs, physic, or various chemicals, a medical clinical laboratory test, food evaluation, quarantine, legal medicine, chemistry, a brewing, agriculture, a fishing, a zootechnics, and forestry.

[0037]

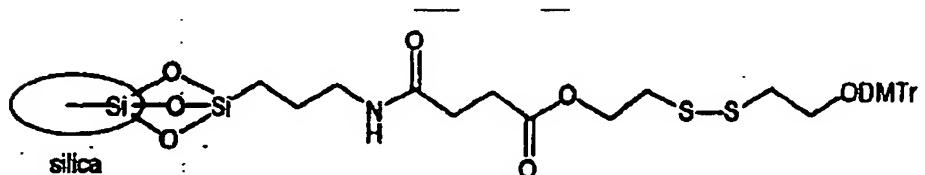
[Effect of the Invention] According to this invention, by using the DNA chip which introduced the intercalator into DNA made to fix to a probe fixed electrode by covalent bond, it becomes possible to make an intercalation reaction perform quickly, and, thereby, the interaction of a specimen and a DNA probe can be detected to the inside of a short time.

[0038]

[Example] (1) Composition of the synthetic qualification oligonucleotide of a qualification oligonucleotide (DNA probe) applied the silica support (KURUAKEMU manufacture, the SOWA TRADING sale, 3'C3 thiol column) which has the following structure which, and is marketed, and which was formed into disulfide induction to the DNA automatic composition machine (a DNA/RNA automatic composition machine, ABI394, ABI company manufacture), and was performed with the usual solid phase synthesis method. [2'-O-anthraquinonyl methyl N3-benzoyl uridine friend]

[0039]

[Formula 5]



[0040] The compound qualification oligonucleotide refined by polyacrylamide electrophoresis (PAGE), after starting from the support by ammoniation, and it performed demineralization processing. The array of the compound qualification oligonucleotide is shown below.

5' --'-dACAU(2'AQ) GCAGTGTTGATpDS-3' -- in addition, it is shown during an array display that anthraquinone is carrying out covalent bond of the U (2'AQ) at least

to 2' of a uridine through a methylene group. Moreover, it is shown that DS radical, i.e., -(CH₂)-S-S-(CH₂)-OH, is carrying out covalent bond of the TpDS at least to 3' of thymidine.

[0041] It was checked with the ion spray mass spectrum that the disulfide radical had been introduced into the DNA probe.

(2) The electrode substrate which made gold vapor-deposit on the production slide glass of the golden electrode (probe fixed electrode) which fixed the qualification oligonucleotide was cut into the magnitude of 0.4x1.3 (cm), lead wire was fixed to this with a silver paste and adhesives, and the golden electrode was produced.

[0042] After dipping this golden electrode in an acid mixed solution (concentrated hydrochloric acid: 30% hydrogen-peroxide-solution =7:3) for 1 – 2 minutes, Purity and a phosphate buffer solution (0.01M dibasic-sodium-phosphate water solution containing 0.1MNaCl (pH7)) wash. It dips in the phosphoric-acid buffer solution (the 0.01M dibasic-sodium-phosphate water solution containing 0.1MNaCl (pH7); amount of 30 in 200microl buffer solution O.D.) of the qualification oligonucleotide set as the concentration of 1mM for about one week. The probe fixed electrode was produced by self-accumulation of a qualification oligonucleotide to a golden electrode surface.

(3) A series of valve flow coefficient measurement of the double strand of AQ1 to which the concentration of the specimen DNA strand which has a complementary array was changed was carried out to the single strand of the electrochemical response anthraquinone qualification oligonucleotide (AQ1) of a qualification DNA probe, and the array acquired by (1) using the POTENSHOME tree analyzer (valve flow coefficient50W, BI A S company manufacturing and selling).

[0043] Each voltamogram of AQ1 single strand at the time of performing valve flow coefficient measurement to drawing 1 with the scan speed of 200 mV/s using the buffer solution which is the single strand oligomer concentration of 1mM, and a double strand is shown. In drawing 1 , a continuous line shows the curve originating in the reaction of a single stranded DNA and an anthraquinone frame, and the chain line shows the curve originating in the reaction of double stranded DNA and an anthraquinone frame.

[0044] According to drawing 1 , the direction of the summit potential value which the curve which originates [in / both / the summit potential value of reduction reaction time and the summit potential value of oxidation reaction time] in double stranded DNA shows has shifted in the direction in which potential becomes small. Therefore, in a strange sample, when same measurement is carried out and the shift of such a summit potential value is observed, Specimen DNA will exist in that sample and

detection of this specimen DNA is attained.

[0045] Moreover, the concentration of Specimen DNA is fluctuated to drawing 2 , and the change of half-wave potential E1/2 when performing valve flow coefficient measurement with the scan speed of 200 mV/s is shown. Here, half-wave potential means the potential with which oxidation potential and reduction potential are saturated, and specifically points out the midpoint potential of the summit potential of oxidation reaction time, and the summit potential of reduction reaction time.

According to drawing 2 , half-wave potential E1/2 shifted in the forward direction with the increment in the concentration of the specimen DNA in a sample, and when a DNA probe (AQ1) and the equivalent were reached and all AQ(s)1 formed the double strand, there was an inclination stabilized in fixed potential. That is, change for which it depended on the concentration of Specimen DNA by investigating half-wave potential is plotted, and it becomes possible to get to know the concentration of Specimen DNA.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-83968

(P2003-83968A)

(43)公開日 平成15年3月19日 (2003.3.19)

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/53

識別記号
Z N A

F I
G 0 1 N 33/53

コード(参考)
Z N A M 2 G 0 4 5

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

D 4 B 0 2 4

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

A 4 B 0 2 9

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/483

A 4 B 0 6 3

F

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-280137(P2001-280137)

(71)出願人 000004178

シェイエスアール株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(22)出願日 平成13年9月14日 (2001.9.14)

(72)発明者 山名 一成

兵庫県姫路市北新在家3丁目5-1

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月15日

(72)発明者 熊本 諭

大阪府堺市田園786-13

社団法人日本化学会発行の「日本化学会第79春季年会
2001年 講演予稿集Ⅱ」に発表

(72)発明者 長谷川 哲也

兵庫県姫路市勝原区丁182-26

(74)代理人 100081994

弁理士 鈴木 俊一郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAチップおよびアッセイ方法

(57)【要約】

【課題】 検出感度が高く、ノイズが低く、インターラーティの挿入時間が短く、安定で、しかも短時間のうちにDNAの検出を可能にする。

【解決手段】 本発明に係るDNAチップは、インターラーティが結合されているDNAプローブを固定した電極を有することを特徴としている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターカレータが結合されているDNAプローブを固定した電極を有することを特徴とするDNAチップ。

【請求項2】 インターカレータが導電性有機化合物であることを特徴とする請求項1記載のDNAチップ。

【請求項3】 導電性有機化合物がアントラキノン、ナフトキノン、キノン、ポルフィリン、ダウノマイシン、フェロセン、フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体、水溶性フラーレン誘導体、エチジウム、エチジウムプロマイド、アクリジン、アミノアクリジン、アクリジンオレンジ、アジドアクリジン、エチジウムモノアジド、エチジウムジアジド、プロフラビン、エリプチシン、ヘキスト33342、ヘキスト33258、アクラルビジン、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)、アドリアマイシン、エピルビシン、ビラルビシン、アクラシノマイシン、トリス(フェナントロリン)亜鉛錯体、トリス(フェナントロリン)ルテニウム錯体、トリス(フェナントロリン)コバルト錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、ビピリジンプラチナ錯体、トリス(ビピリジル)亜鉛錯体、トリス(ビピリジル)ルテニウム錯体、トリス(ビピリジル)コバルト錯体、ジ(ビピリジル)亜鉛錯体、ジ(ビピリジル)ルテニウム錯体、ジ(ビピリジル)コバルト錯体から選ばれる化合物またはその誘導体であることを特徴とする請求項2記載のDNAチップ。

【請求項4】 インターカレータが、DNAプローブの糖骨格における糖の2'位の-OH基にアルキレン基を介して共有結合させたアントラキノンまたはその誘導体であることを特徴とする請求項3に記載のDNAチップ。

【請求項5】 インターカレータが結合されているDNAプローブの末端がチオール化またはジスルフィド化されていることを特徴とする請求項1記載のDNAチップ。

【請求項6】 インターカレータが結合されているDNAプローブを固定した電極を有するDNAチップに検体である標的物質を接触させ、次いで電極への電気信号の入出力を検出することを特徴とするDNAチップを用いたアッセイ方法。

【請求項7】 前記標的物質は、核酸またはタンパク質であることを特徴とする請求項6に記載のアッセイ方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、修飾DNAを導入してなるDNAチップおよび当該DNAチップを用いたアッセイ方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ヒト

の遺伝子をはじめとするゲノムプロジェクトが進められ、多数の遺伝子構造が明らかにされてきた。遺伝子構造解析の結果を有効利用した遺伝子機能や発現の研究が、生命現象の謎の解明のみならず、疾患の予防と診断、医薬品の開発等に新しい道を開くための重要なテーマとなっている。これら研究を進めるためには、遺伝子の発現や変異、多型性を解析することが重要である。このような解析を簡便かつ迅速に行うには、所定の塩基配列を持つDNAプローブと解析の対象となる検体DNAの結合(ハイブリダイゼーション)を効率よくモニターすることが必要不可欠である。

【0003】 従来において、ハイブリダイゼーション後の検体DNAの検出のために、放射線同位元素または蛍光体を用いた検出、あるいは電気化学的な検出などが採用されてきた。検出の感度を上げるために、ヘキスト33258、ヘキスト33342、フェロセン、フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体、水溶性フラーレン誘導体、ルテニウム錯体、亜鉛錯体、プラチナ錯体、コバルト錯体などの外部挿入型インターハイブリダイゼーションが使用されてきた。

【0004】 しかし、これらの外部インターハイブリダイゼーションは、DNAプローブとこのDNAプローブに相補的な配列を有するDNAとで特異的に形成される二本鎖DNAのみならず一本鎖DNAにも結合し、この結合は二本鎖DNA以外のものに基づくシグナルを発生させるため、検出ノイズとなり、二本鎖DNAの特異的結合検出感度を低下させる結果が生じる。

【0005】 また、電気化学的な検出は、検出感度が良好であることから望まれる検出方法であるが、従来のインターハイブリダイゼーションが結合した二本鎖DNAから素早く離脱するために、インターハイブリダイゼーションが起こった状態は不安定であり、インターハイブリダイゼーションを電気化学的に検出することが困難であるという問題点が存在した。そこで、本発明は、上述した実情に鑑みてなされたものであり、検出感度が高いDNA検出が可能なDNAチップを提供するためのDNAチップ、およびこのDNAチップを用いたアッセイ方法を提供することを目的としている。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明に係るDNAチップは、上述した問題を解決するために、インターハイブリダイゼーションが結合されたDNAプローブを固定した電極を有することを特徴としている。また、インターハイブリダイゼーションが導電性有機化合物であることが好ましく、さらに導電性有機化合物がアントラキノン、ナフトキノン、キノン、ポルフィリン、ダウノマイシン、フェロセン、フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体、水溶性フラーレン誘導体、エチジウム、エチジウムプロマイド、アクリジン、アミノアクリジン、アクリジンオレンジ、アジドアクリジン、エチジウムモノアジド、エチジウムジアジド、ブ

ロフラビン、エリプチシン、ヘキスト33342、ヘキスト33258、アクラルビジン、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)、アドリアマイシン、エビルビシン、ビラルビシン、アクラシノマイシン、トリス(フェナントロリン)亜鉛錯体、トリス(フェナントロリン)ルテニウム錯体、トリス(フェナントロリン)コバルト錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、ビピリジンプラチナ錯体、トリス(ビピリジル)亜鉛錯体、トリス(ビピリジル)ルテニウム錯体、トリス(ビピリジル)コバルト錯体、ジ(ビピリジル)亜鉛錯体、ジ(ビピリジル)ルテニウム錯体、ジ(ビピリジル)コバルト錯体から選ばれる化合物またはその誘導体であることが好ましい。特には、インターラーゲータが、DNAプローブの糖骨格における糖の2'位の-OH基にアルキレン基を介して共有結合させたアントラキノンまたはその誘導体であることが好ましい。

【0007】また、インターラーゲータが結合されているDNAプローブの末端がチオール化またはジスルフィド化されていることが好ましい。本発明に係るアッセイ方法は、インターラーゲータが結合されているDNAプローブを固定した電極を有するDNAチップに検体である標的物質を接触させ、次いで電極への電気信号の入出力を検出することを特徴とするDNAチップを用いたものである。

【0008】また、前記標的物質は、核酸またはタンパク質であることが好ましい。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明に係るDNAチップおよびアッセイ方法の具体的な態様について、図面を参照しながら詳細に説明する。前記DNAチップの一実施態様は、適当な面積を有する基板の一面にDNAプローブを固定する電極(以下、「プローブ固定電極」という)が形成され、基板のもう一方の面に電気的検出装置に接触できる電極(以下、「検出電極」という)が形成されてなり、前記2つの電極が電気的に導通する構造となっているものである。

【0010】本発明者は、DNAハイブリダイゼーションを電気的信号(電気化学シグナル)を利用して検出することについて鋭意検討してきた結果、DNA二重らせんの塩基対間に電気化学活性を有するインターラーゲータを挿入(インターラーション)させることで、DNA塩基対とインターラーゲータとの間で電子による電子移動反応が起こり、この電子移動反応により生じる電気的信号を直接の監視シグナルとして利用することができるを見出して、本発明を完成するに至った。

【0011】したがって、このようなインターラーゲータは導電性有機化合物であることが好ましい。さらに、この導電性有機化合物は、アントラキノン、ナフトキノン、キノン、ポルフィリン、ダウノマイシン、フェロセン、フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体、水溶性フ

ラーレン誘導体、エチジウム、エチジウムプロマイド、アクリジン、アミノアクリジン、アクリジンオレンジ、アジドアクリジン、エチジウムモノアジド、エチジウムジアジド、プロフラビン、エリプチシン、ヘキスト3342、ヘキスト33258、アクラルビジン、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)、アドリアマイシン、エビルビシン、ビラルビシン、アクラシノマイシン、トリス(フェナントロリン)亜鉛錯体、トリス(フェナントロリン)ルテニウム錯体、トリス(フェナントロリン)コバルト錯体、フェナントロリンプラチナ錯体、ビピリジンプラチナ錯体、トリス(ビピリジル)亜鉛錯体、トリス(ビピリジル)ルテニウム錯体、トリス(ビピリジル)コバルト錯体、ジ(ビピリジル)亜鉛錯体、ジ(ビピリジル)ルテニウム錯体、ジ(ビピリジル)コバルト錯体、その他ルテニウム錯体、亜鉛錯体、プラチナ錯体、コバルト錯体などの外部挿入型インターラーゲータなどから選ばれる化合物またはその誘導体であることが好ましく、特にアントラキノン、ナフトキノン、キノンが好ましい。

【0012】また、一般的に芳香環の縮合で構成されるインターラーゲータは疎水性が高いため、インターラーション反応においては親水的な環境にあるDNA塩基対に近づくことが律速段階になり、一般にインターラーションを検出するためには、インターラーション反応が平衡状態になるまで待たなくてはならず、迅速な検出を行うことが困難である。

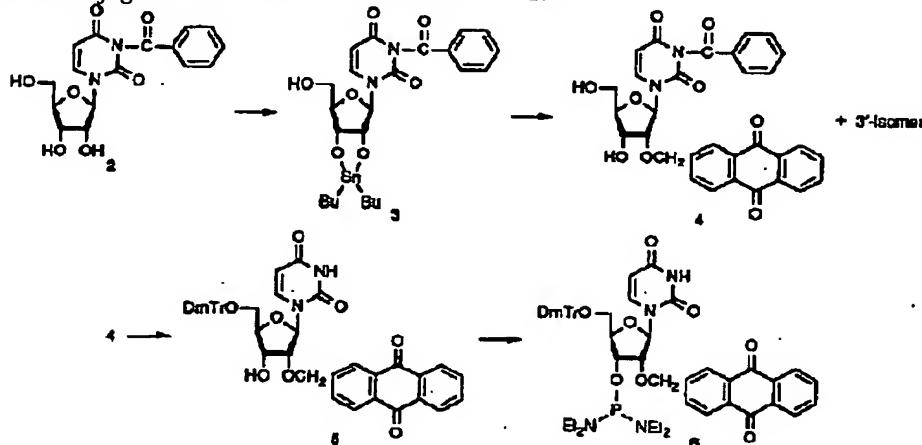
【0013】そこで、DNA鎖中にインターラーゲータを固定する、すなわちDNA鎖のいずれかの基とインターラーゲータとを共有結合させることで、インターラーション反応を迅速に行なうことが可能になる。本発明者は、インターラーゲータをDNA鎖中に導入することについて鋭意検討した結果、DNAの任意の糖骨格へインターラーゲータを導入する効率のよい一般的な方法を開発した。

【0014】この方法によれば、インターラーゲータをDNA鎖の糖骨格の2'位に導入することが最も効率よく、インターラーゲータをDNA鎖中に導入できることがわかった。したがって、この態様においては、インターラーゲータが、DNAプローブの糖骨格における糖の2'位の-OH基に、例えば炭素数1~2のアルキレン基、好ましくは炭素数1のメチレン基を介して共有結合させたアントラキノンまたはその誘導体であることが特に好ましい。

【0015】このような修飾DNAプローブを合成する方法は、2'位にアントラキノンを導入したモノマー、例えば2'-0-アントラキノニルメチルN³-ベンゾイルウリジニアミダイトを原料DNAモノマーの一つとして用いてDNA自動合成機に適用して行なう通常の固相重合法が挙げられる。合成した修飾オリゴヌクレオチドは、通常の方法、すなわちアンモニア処理による担体からの切り出し、ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)による精

製、脱塩処理を施した後、用いることができる。

【0016】ここで、例えば2'-0-アントラキノニルメチルN³-ベンゾイルウリジンアミダイトを得る方法は、
Yamana et al. Bioconjugate Chem. 1990, 1, 319-324*



【0018】また、プローブ固定電極の材質は、DNAプローブが固定可能で、導電性のあるものであれば特に限定されないが、たとえば、金、銀、銅、プラチナ、アルミニウム、ニッケル、パラジウム、ゲルマニウム、モリブデン、タンクステン等の金属単体、それらの合金、グラファイト、ダイヤモンド薄膜の炭素などが使用可能である。これらの中では、炭素、金、プラチナが好ましく、特に111結晶配向した金が望ましい。

【0019】これらの電極の形成方法は、特に限定されないが、有機あるいは無機の絶縁基材の上に上記導電性材料層（上記金属など）を蒸着、スパッタ、メッキなどの方法で形成し、フォトレジスト等の方法で電極パターンングすることが可能である。その際に電極のみならず、電気化学検出装置への接続端子および電極と接続端子を結ぶ配線も併せてパターンングすることが可能である。

【0020】また、電極上にDNAプローブを固定する方法は、特に限定されないが、電極側を予めアミノ処理、カルボジイミドあるいはシランカップリング処理してDNAプローブと電極とを共有結合させる方法、DNA末端に共有結合基を設ける方法などである。これらの中では、DNA末端に共有結合基を設ける方法、例えばDNAプローブ末端をチオール化またはジスルフィド化しておく方法が特に好ましい。

【0021】一般に、チオールおよびジスルフィド化合物は、金表面に吸着して自己組織化単分子膜を形成し、欠陥の少ない高配向性単分子膜を作製することが知られている。したがって、インターラーティが結合されているDNAプローブをチオール化またはジスルフィド化し、このチオール基またはジスルフィド基（-S-S-）にて、プローブ固定電極を形成する材質表面に吸着させることができ。特に、DNAプローブの鎖の

*において開示された方法、すなわち下記のスキームに従って合成して得られる。

【0017】

【化1】

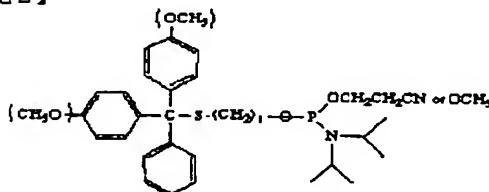
20 3'末端または5'末端の一OH基にチオールまたはジスルフィド化合物を共有結合させることができ。3'

【0022】このチオール化またはジスルフィド化したDNAプローブを得る方法は、インターラーティを導入したDNAプローブ合成に用いるモノマーである修飾ヌクレオシドホスホアミダイトを結合させた、市販のチオール誘導化またはジスルフィド誘導化試薬を用いて、DNA自動合成機に適用して行う通常の固相重合法が挙げられる。合成した修飾オリゴヌクレオチドは、通常の方法、すなわちアンモニア処理による担体からの切り出し、ポリアクリルアミド電気泳動（PAGE）による精製、脱塩処理を施した後、用いることができる。

30 【0023】ここで、チオール化試薬としては、下記の構造を有するものが挙げられる。

【0024】

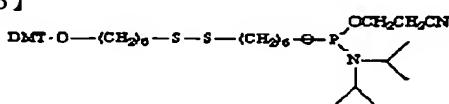
【化2】



40 【0025】また、ジスルフィド誘導化試薬としては、下記の構造を有するものが挙げられる。

【0026】

【化3】

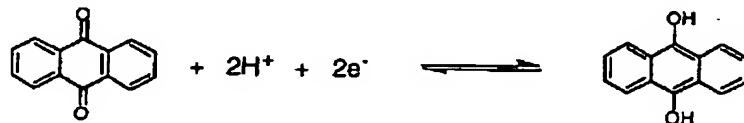


50 【0027】なお、このチオール誘導化またはジスルフィド誘導化インターラーティ導入DNAの構造確認は、

イオンスプレーマススペクトルにより行うことができる。プローブ固定電極の作製方法において、例えば電極材質が金の場合を例に挙げると、まず、スライドガラス上に金を蒸着して電極基板を得て、必要に応じてこのスライドガラスを所望の大きさに切り、得られた電極基板にリード線を銀ペーストおよび接着剤を用いて固定し、金電極を作製する。さらに、必要に応じてこの金電極の表面を酸で処理して、水およびリン酸緩衝液で洗浄した後、修飾DNAプローブを含むリン酸緩衝液に金電極を浸して、金電極表面への修飾DNAプローブの自己集積化により、あるいは金表面電極に修飾DNAプローブをスポットтерによりスポットすることにより、金表面に修飾DNAプローブが固定されたプローブ固定電極を得る。

【0028】また、本発明に係るアッセイ方法の一実施態様は、前述したようなインターラーカレータが結合されているDNAプローブを固定した電極を有するDNAチップに、検体である標的物質を接触させ、次いで電極、すなわち検出電極への電気信号の入出力を検出するものである。ここで、前記標的物質としては、DNA、RNAなどの核酸、タンパク質などが挙げられる。

【0029】また、検出される電気信号としては、電 *



$$K = [AQH_2] / [AQ][H^+]^2 \quad (1)$$

$$E = E_0 - (RT/nF) \ln K \quad (2)$$

【0032】この酸化還元反応において、還元反応は右方向であり、酸化反応は左方向である。また、この反応の平衡定数Kは、式(1)のようにして求められる。式(1)中、 $[AQH_2]$ は還元型のアントラキノン(右)の濃度を示し、 $[AQ]$ は酸化型のアントラキノン(左)の濃度を示す。また、ポテンシャル(反応電位)は、式(2)で求められる。式(2)中、 E_0 は標準状態(活量定数1)における平衡電極電位を示し、Rは気体定数を示し、Tは系の温度を示し、Fはファラデー定数を示し、nはイオン価を示す。

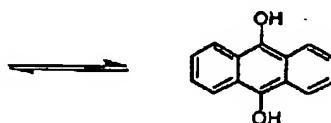
【0033】したがって、このポテンシャルのシフトの有無を検出することで、二重鎖の形成を検出することができる。また、前記式(2)によれば、電位は酸化還元反応の平衡定数Kに依存しており、この平衡定数Kは還元型のアントラキノンの濃度 $[AQH_2]$ に依存する。このことは、インターラーカレーションに関与したアントラキノンの濃度に依存することを意味し、これによりピーク電位を調べることで、インターラーカレーションに関与したアントラキノンの濃度、すなわち試料中の検体の

* 流、電気導電度、電位、電気容量、インダクタンス、インピーダンス等の電気的な信号が挙げられ、サイクリックボルタモグラフィー(CV)、ディファレンシャルパルスボルタモグラフィー(DPV)、リニアスイープボルタモグラフィーおよびポテンショスタット等の装置により測定される。

【0030】例えば、CVによるモニターにおいては、後述する実施例にて得られた、図1に示したような曲線が得られる。図1においては、一重鎖のDNA由来の曲線を実線で示し、インターラーカレーション反応後の二重鎖DNA由来の曲線を鎖線で示す。図1によれば、還元反応曲線(上側)のピーク電流を与えるポテンシャル(mV)、すなわちピーク電位も、酸化反応曲線(下側)のピーク電流を与えるピーク電位(mV)も、インターラーカレーションが生じた系の方が小さい。これは、インターラーカレーションが起こると、インターラーカレータとDNAの塩基対との間で電子移動反応、すなわちアントラキノン部分で下記のような酸化還元反応が起こり、系の電子状態に変化が生じ、このようなピーク電位のシフトが生じることを示す。

【0031】

【化4】



濃度も知ることができる。

【0034】なお、インターラーカレーション反応が起こると、インターラーカレータ導入DNAの化学環境が変化することが考えられる。一方、この化学環境の変化は、DNAの塩基配列の種類にも依存すると考えられる。したがって、電子移動反応に基づく電子状態の変化をDNA塩基配列にしたがって系統的に調査することで、例えば検体のDNA中にミスマッチ塩基対などの変異が存在することなどを調査結果に基づいて検出できるようになる。

【0035】また、DNA二重鎖の他にも、RNA-DNAハイブリダイズも検出可能である。また、DNA-タンパク質相互作用のように、DNAと他の薬物との反応は、DNA構造を大きく変化させることが知られている。したがって、このような相互作用も、発生させる電気信号を変化させるため、本発明に係るDNAチップを使って検出することが可能になる。

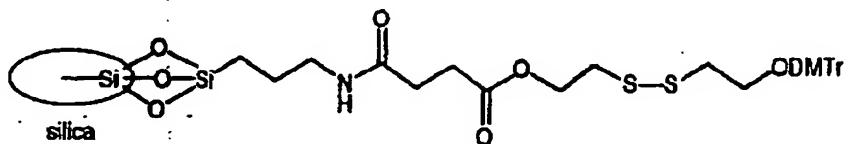
【0036】本発明のDNAチップおよびアッセイ方法は、遺伝子発現解析、1遺伝子多型解析(SNP)、医薬創薬、医薬品のスクリーニング、医薬あるいは各種化

学物質の安全性検査、医療の臨床検査、食品検査、検疫、法医学、化学、醸造、農業、漁業、畜産および林業等の分野に適用可能である。

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、プローブ固定電極に固定させるDNAに共有結合によりインターラーニングを導入したDNAチップを用いることで、インターラーニング反応を迅速に行わせることが可能になり、これにより、短時間のうちに検体とDNAプローブとの相互作用を検出することができる。

【0038】



【0040】合成した修飾オリゴヌクレオチドは、アンモニア処理による担体からの切り出しののち、ポリアクリルアミド電気泳動（PAGE）により精製を行い、脱塩処理を施した。合成した修飾オリゴヌクレオチドの配列を下記に示す。

5'-dACAU(2'AQ)GCAGTCTTGATpDS-3'

なお、配列表示中、U(2'AQ)は、ウリジンの2'位にアントラキノンがメチレン基を介して共有結合していることを示す。また、TpDSは、チミジンの3'位にDS基、すなわち- (CH_2) -S-S- (CH_2) -OHが共有結合していることを示す。

【0041】DNAプローブにジスルフィド基が導入されたことは、イオンスプレーマススペクトルにより確認した。

(2) 修飾オリゴヌクレオチドを固定した金電極（プローブ固定電極）の作製

スライドガラス上に金を蒸着させた電極基板を、0.4×1.3 (cm) の大きさにカットし、これにリード線を銀ペーストおよび接着剤で固定し金電極を作製した。

【0042】この金電極を、酸混合溶液（濃塩酸：30%過酸化水素水=7:3）に1~2分間浸したのち、純粹およびリン酸緩衝液（0.1M NaClを含む0.01Mリン酸水素ナトリウム水溶液（pH 7））で洗浄し、1mMの濃度に設定した修飾オリゴヌクレオチドのリン酸緩衝溶液（0.1M NaClを含む0.01Mリン酸水素ナトリウム水溶液（pH 7）；200μl緩衝液中30.0.D.の量）に約1週間浸し、金電極表面への修飾オリゴヌクレオチドの自己集積により、プローブ固定電極を作製した。

(3) 修飾DNAプローブの電気化学的応答

アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド（AQ1）の一本鎖、および(1)で得られた配列に相補的な配列を有す

* 【実施例】(1) 修飾オリゴヌクレオチド（DNAプローブ）の合成

修飾オリゴヌクレオチドの合成は、2'-0-アントラキノニルメチル N³-ペニソイルウリジンアミダイトおよび市販されているジスルフィド誘導化した下記構造を有するシリカサポート（クルアケム社製造、桑和貿易販売、3'C3チオールカラム）を、DNA自動合成機（DNA/RNA自動合成機、ABI394、ABI社製造）に適用し、通常の固相合成法により行った。

10 【0039】

【化5】

る検体DNA鎖の濃度を変化させた一連のAQ1の二本鎖のCV測定を、ポテンショメトリー・アナライザ（CV 50W、ビー・エー・エス社製造販売）を用いて行った。

【0043】図1に、1mMの一本鎖オリゴマー濃度である緩衝溶液を用いて、200mV/sのスキャン速度でCV測定を行った際のAQ1一本鎖、二本鎖のそれぞれのボルタモグラムを示す。図1において、実線は一本鎖DNAとアントラキノン骨格との反応に由来する曲線を示し、鎖線は二本鎖DNAとアントラキノン骨格との反応に由来する曲線を示す。

【0044】図1によれば、還元反応時のピーク電位値および酸化反応時のピーク電位値においてともに、二本鎖DNAに由来する曲線が示すピーク電位値の方が電位が小さくなる方向にシフトしている。したがって、未知の試料において、同様の測定をし、このようなピーク電位値のシフトが観測されたときには、その試料中に検体DNAが存在することになり、この検体DNAの検出が可能になる。

【0045】また、図2に、検体DNAの濃度を変動させて、200mV/sのスキャン速度でCV測定を行ったときの半波電位 $E_{1/2}$ の変化を示す。ここで、半波電位とは、酸化電位と還元電位とが飽和する電位をいい、具体的には酸化反応時のピーク電位と還元反応時のピーク電位との中間点電位を指す。図2によれば、試料中の検体DNAの濃度の増加に伴って半波電位 $E_{1/2}$ が正方向にシフトし、DNAプローブ（AQ1）と当量に到達してすべてのAQ1が二本鎖を形成すると一定の電位で安定する傾向があった。すなわち、半波電位を調べることで検体DNAの濃度を知ることが可能になる。

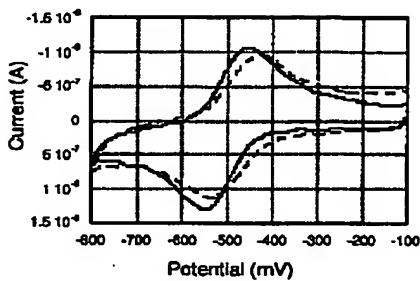
【図面の簡単な説明】

11

【図1】図1は、本発明に係るDNAチップの実施態様において、DNAプローブと検体DNAとの二重鎖形成を検出するためのサイクリックボルタモメトリー(CV)により得られる曲線を示すグラフである。

*

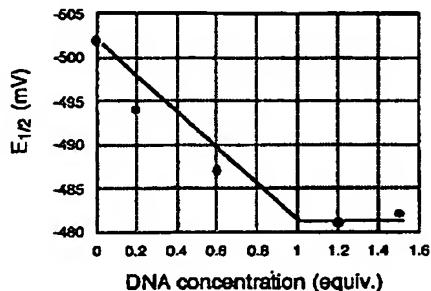
【図1】



12

* 【図2】図2は、前記実施態様において、検体DNAの濃度に依存したCV測定における半波電位 $E_{1/2}$ の値の変化を示すグラフである。

【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7
 G 0 1 N 27/27
 27/327
 27/416
 33/483
 33/58
 37/00 識別記号 1 0 2

F I
 G 0 1 N 33/58
 37/00
 C 1 2 N 15/00
 G 0 1 N 27/30
 27/46
 テーマコード (参考)
 A
 1 0 2
 F
 3 5 1
 A
 3 3 6 M

(72) 発明者 中野 英彦
 兵庫県姫路市田寺東1-4-17
 (72) 発明者 松尾 吉晃
 兵庫県姫路市辻井8-15-6 兵庫県教職
 員住宅206号
 (72) 発明者 杉江 他曾宏
 兵庫県加古川市尾上町口里817-4

F ターム(参考) 2G045 BA01 BA11 BA13 BB21 BB60
 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
 FB05 FB07 FB16 GC16 GC18
 GC20
 4B024 AA20 CA01 CA09 CA11 HA19
 4B029 AA07 AA23 FA12
 4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35
 QR55 QS34 QX04